

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
4. Oktober 2001 (04.10.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/72742 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: C07D 405/06, A61K 31/34, A61P 7/10, C07D 307/81

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/03474

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(22) Internationales Anmeldedatum: 27. März 2001 (27.03.2001)

Deutsch

(25) Einreichungssprache: Deutsch

Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität: 100 15 248.1 28. März 2000 (28.03.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): MERCK PATENT GMBH [US/US]; Frankfurter Strasse 250, 64293 Darmstadt (US).

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist; Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen

(72) Erfinder; und

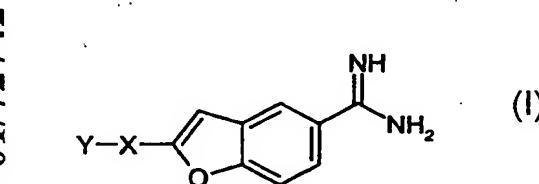
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): GERICKE, Rolf [DE/DE]; Mozartstrasse 19, 64342 Seeheim (DE). BEIER, Norbert [DE/DE]; Maximilian-Kolbe-Strasse 11, 64354 Reinheim (DE). WILM, Claudia [DE/DE]; Dahlienweg 24, 64291 Darmstadt (DE). RADDATZ, Peter [DE/DE]; Im Kirschenland 27, 64665 Alsbach (DE).

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(74) Anwalt: ISENBRUCK, Günter; Bardehle, Pagenberg, Dost, Altenburg, Geissler, Isenbruck, Theodor-Heuss-Anlage 12, 68165 Mannheim (DE).

(54) Title: BISAMIDINO COMPOUNDS AS NHE-3 INHIBITORS

(54) Bezeichnung: BISAMIDINO-VERBINDUNGEN ALS NHE-3 INHIBTOREN



Natrium/Protonen-Austauschers Subtyp 3(NHE-3).

(57) Abstract: The invention relates to compounds of formula (I), wherein X and Y have the meanings given in claim number 1. Said compounds are inhibitors of the sodium/proton exchanger subtype 3 (NHE-3).

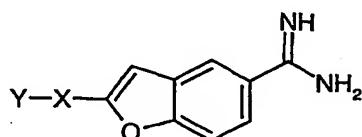
(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Verbindungen der Formel (I), worin X, Y die in Patentanspruch 1 angegebene Bedeutung haben. Die Verbindungen sind Inhibitoren des

- 1 -

Bisamidino-Verbindungen als NHE-3 Inhibitoren

Die Erfindung betrifft die Verwendung von Verbindungen der Formel I

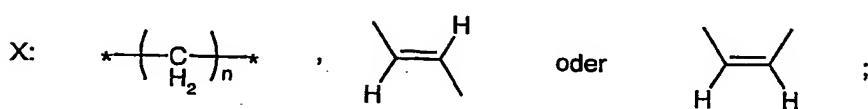
5



10

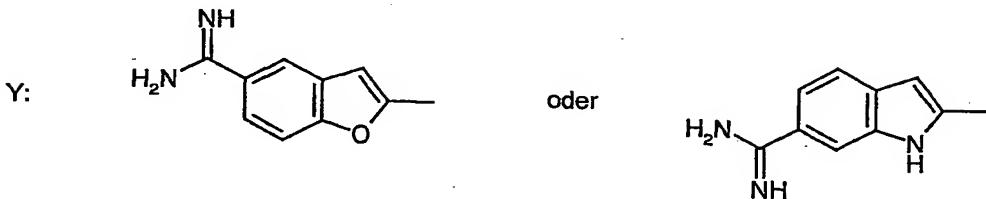
worin bedeuten

15



n: einen ganzzahligen Wert zwischen 1 und 6

20



25

sowie deren Salze und Solvate als NHE-Inhibitoren.

30

Natrium/Protonenaustauscher oder Antiporter sind Transportproteine, die in der Plasmamembran angeordnet sind und extrazelluläres Na^+ gegen intrazelluläres H^+ austauschen. Diese Proteine werden in allen Tieren gefunden. Die Na^+/H^+ -Austauscher bilden eine Familie mit mindestens sechs unterschiedlichen Isoformen (NHE-1 bis NHE-6), die inzwischen alle kloniert worden sind. Während der Subtyp NHE-1 ubiquitär im ganzen Körper in allen Geweben verteilt ist, werden die übrigen NHE-Subtypen selektiv in spezifischen Organen wie in der Niere oder in der Lumenwand und

35

Kontraluminalwand des Dünndarms exprimiert. Diese Verteilung spiegelt die spezifischen Funktionen wieder, denen die verschiedenen Isoformen dienen, nämlich einerseits die Regulation des intrazellulären pH-Werts und des Zellvolumens durch den Subtyp NHE-1 und andererseits die Na^+ -

5 Aufnahme und –wiederaufnahme in Darm und Niere durch die Isoformen NHE-2 bzw. NHE-3. Die Isoform NHE-4 wird hauptsächlich im Magen gefunden. Die Expression von NHE-5 beschränkt sich auf Gehirn- und Neuronengewebe. NHE-6 stellt diejenige Isoform dar, die den Natrium/Protonen-Austauscher in den Mitochondrien bildet. Die Isoform NHE-3 wird insbesondere in der Apicalmembran der proximalen Nierentubuli exprimiert. Ein NHE-3-Hemmstoff übt daher u.a. eine Nierenschutzwirkung aus.

10

15 Die therapeutische Verwendung eines selektiven Hemmstoffs für NHE-3-Isoformen ist vielseitig. NHE-3-Hemmstoffe hemmen oder verringern Gewebeschäden und Zellnekrosen nach pathophysiologischen hypoxischen und ischämischen Ereignissen, die zu einer Aktivierung der NHE-Aktivität führen, wie dies während Nierenischämie oder während der Entfernung, des Transport und der Reperfusion einer Niere bei der Nierenverpflanzung der Fall ist.

20

25 Inhibitoren des Natrium/Protonen-Austauschers Subtyp 3 sind beispielsweise in der EP 0 825 178 beschrieben.

30 Aufgabe der Erfindung ist es, neue Inhibitoren des Natrium/Protonen-Austauschers zur Verfügung zu stellen.

35 Diese Aufgabe wird gelöst durch die Verwendung von Verbindungen der oben gezeigten Formel I als NHE-Inhibitoren. Die Verbindungen zeigen eine hohe NHE-3 Aktivität, verbunden mit einer ausgeprägten Selektivität gegenüber den NHE-1 und NHE-2-Isoformen.

Bisamidinoverbindungen der Formel I sind grundsätzlich bekannt. Vertreter dieser Substanzklassen sind beispielsweise beschrieben von O. Dann, H. Char und H. Griesmayer, Liebigs Ann. Chem. 1982, 1836 bis 1869, O. Dann, H. Char, P. Fleischmann, H. Fricke, Liebigs Ann. Chem. 1986, 438 bis 455 sowie O. Dann, G. Volz, E. Demant, W. Pfeifer, G. Bergen, H. Fick, E. Walkenhorst, Liebigs Ann. Chem. 1973, 1112 bis 1140. Die Autoren untersuchten auch die trypanociden und antileukämischen Eigenschaften dieser Substanzen.

10

Die Verbindungen der Formel I wirken blutdrucksenkend und eignen sich als Arzneimittelwirkstoffe zur Behandlung der Hypertonie. Weiterhin eignen sie sich als Diuretika.

15

Die Verbindungen der Formel I wirken alleine oder in Verbindung mit NHE-Inhibitoren anderer Subtypspezifität antiischämisch und können verwendet werden bei Thrombosen, Atherosklerose, Gefäßspasmen, zum Schutz von Organen, z.B. Niere und Leber, vor und während Operationen, sowie bei 20 chronischem oder akutem Nierenversagen.

20

Weiterhin können sie verwendet werden zur Behandlung von Schlaganfall, des Hirnödems, Ischämien des Nervensystems, verschiedenen Formen 25 des Schocks sowie zur Verbesserung des Atemantriebs bei beispielsweise folgenden Zuständen: zentrale Schlafapnoen, plötzlicher Kindstod, post-operative Hypoxie und anderen Atemstörungen.

25

30

Durch die Kombination mit einem Carboanhydrase-Hemmer kann die Atmungstätigkeit weiter verbessert werden.

35

Die Verbindungen der Formel I wirken inhibierend auf die Proliferationen von Zellen, beispielsweise der Fibroblasten-Zellproliferation und der Prolifération der glatten Gefäßmuskelzellen und können daher zur Behandlung

von Krankheiten verwendet werden, bei denen die Zellproliferation eine primäre oder sekundäre Ursache darstellt.

5 Die Verbindungen der Formel I können verwendet werden gegen diabetische Spätkomplikationen, Krebserkrankungen, fibrotische Erkrankungen, endotheliale Dysfunktion, Organhypertrophie und -hyperplasien, insbesondere bei Prostatahyperplasie bzw. Prostatahypertrophie.

10 Ferner eignen sie sich als Diagnostika zur Bestimmung und Unterscheidung bestimmter Formen der Hypertonie, der Atherosklerose, des Diabetes und proliferativer Erkrankungen.

15 Da die Verbindungen der Formel I auch den Spiegel der Serumlipoproteine vorteilhaft beeinflussen, können sie zur Behandlung eines erhöhten Blutfettspiegels alleine oder in Kombination mit anderen Arzneimitteln eingesetzt werden.

20 Gegenstand der Erfindung ist die Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 und ihrer physiologisch unbedenklichen Salze und/oder Solvate zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Thrombosen, ischämischen Zuständen des Herzens, des peripheren und zentralen Nervensystems und des Schlaganfalls, ischämischen Zuständen peripherer Organe und Gliedmaßen und zur Behandlung von Schockzuständen.

25 30 Gegenstand der Erfindung ist weiter die Verwendung von Verbindungen der Formel I und ihrer physiologisch unbedenklichen Salze und/oder Solvate zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krankheiten, bei denen die Zellproliferation eine primäre oder sekundäre Ursache darstellt, zur Behandlung oder Prophylaxe von Störungen des Fettstoffwechsels oder gestörtem Atemantrieb.

5 Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung von Verbindungen der Formel I und ihrer physiologisch unbedenklichen Salze und/oder Solvate zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von ischämischer Niere, ischämischen Darmerkrankungen oder zur Prophylaxe von akuten oder chronischen Nierenerkrankungen.

10 Methoden zur Identifizierung von Substanzen, die den Natrium/Protonen-Austauscher Subtyp 3 inhibieren, sind z.B. in US 5,871,919 beschrieben.

15 Unter Hydraten versteht man z.B. die Hemi-, Mono- oder Dihydrate, unter Solvaten z.B. Alkoholadditionsverbindungen wie z.B. mit Methanol oder Ethanol.

20 15 Als besonders vorteilhaft in ihrer Wirkung als NHE-3-Inhibitoren haben sich die folgenden Verbindungen erwiesen:

25 a) 2,2-Tetramethylendi-1-benzofuran-5-carboxamidin (1);
b) 2,2-Hexamethylendi-1-benzofuran-5-carboxamidin (2);
c) 2-[2-(6-Amidinoindol-2-yl)ethyl]-1-benzofuran-5-carboxamidin (3);
d) Trans-1,2-bis-(5-amidino-2-benzofuranyl)ethylen (4);

30 25 sowie deren Salze und Solvate.

35 Die Verbindungen der Formel I und auch die Ausgangsstoffe zu ihrer Herstellung werden im übrigen nach an sich bekannten Methoden hergestellt, wie sie in der Literatur (z.B. in den Standardwerken wie Houben-Weyl, Methoden der organischen Chemie, Georg-Thieme-Verlag, Stuttgart) beschrieben sind, und zwar unter Reaktionsbedingungen, die für die genannten Umsetzungen bekannt und geeignet sind. Dabei kann man auch von an sich bekannten, hier nicht näher erwähnten Varianten Gebrauch machen.

Die Ausgangsstoffe können, falls erwünscht, auch *in situ* gebildet werden, so daß man sie aus dem Reaktionsgemisch nicht isoliert, sondern sofort weiter zu den Verbindungen der Formel I umsetzt.

5 Bevorzugt werden die Verbindungen der Formel I nach den von O. Dann et al. in den oben zitierten Literaturstellen beschriebenen Verfahren hergestellt.

10 Die Amidinogruppe wird bevorzugt durch Umwandlung einer Cyanogruppe durch Umsetzung mit z.B. Hydroxylamin und anschließender Reduktion des N-Hydroxyamidins mit Wasserstoff in Anwesenheit eines Katalysators wie z.B. Pd/C oder Raney-Nickel erhalten. Zur Herstellung der Amidin-Gruppe kann auch an ein entsprechendes Nitril Ammoniak angelagert werden. Die Anlagerung erfolgt bevorzugt mehrstufig, indem man in an sich bekannter Weise

15

20 a) das Nitril mit H_2S in ein Thioamid umwandelt, das mit einem Alkylierungsmittel, z.B. CH_3I , in den entsprechenden S-Alkyl-Imidothioester übergeführt wird, welcher seinerseits mit NH_3 zum Amidin reagiert,

b) das Nitril mit einem Alkohol, z.B. Ethanol in Gegenwart von HCl in den entsprechenden Imidoester umwandelt und diesen mit Ammoniak behandelt, oder

25 c) das Nitril mit Lithium-bis-(trimethylsilyl)-amid umsetzt und das Produkt anschließend hydrolysiert.

30 Eine Base der Formel I kann mit einer Säure in das zugehörige Säure-additionssalz übergeführt werden, beispielsweise durch Umsetzung äquivalenter Mengen der Base und der Säure in einem inerten Lösungsmittel wie Ethanol und anschließendes Eindampfen. Für diese Umsetzung kommen insbesondere Säuren in Frage, die physiologisch unbedenkliche Salze liefern. So können anorganische Säuren verwendet werden, z.B. Schwefelsäure, Salpetersäure, Halogenwasserstoffsäuren wie Chlorwas-

35

serstoffsäure oder Bromwasserstoffsäure, Phosphorsäuren wie Orthophosphorsäure, Sulfaminsäure, ferner organische Säuren, insbesondere aliphatische, alicyclische, araliphatische, aromatische oder heterocyclische ein- oder mehrbasige Carbon-, Sulfon- oder Schwefelsäuren, z.B. Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Pivalinsäure, Diethylessigsäure, Malonsäure, Bernsteinsäure, Pimelinsäure, Fumarsäure, Maleinsäure, Milchsäure, Weinsäure, Äpfelsäure, Citronensäure, Gluconsäure, Ascorbinsäure, Nicotinsäure, Isonicotinsäure, Methan- oder Ethansulfonsäure, Ethandisulfonsäure, 2-Hydroxyethansulfonsäure, Benzolsulfonsäure, p-Toluolsulfonsäure, Naphthalin-mono- und -disulfonsäuren, Laurylschwefelsäure. Salze mit physiologisch nicht unbedenklichen Säuren, z.B. Pikrate, können zur Isolierung und /oder Aufreinigung der Verbindungen der Formel I verwendet werden.

15 Andererseits können Verbindungen der Formel I mit Basen (z.B. Natrium- oder Kaliumhydroxid oder -carbonat) in die entsprechenden Metall-, insbesondere Alkalimetall- oder Erdalkalimetall-, oder in die entsprechenden Ammoniumsalze umgewandelt werden.
Auch physiologisch unbedenkliche organische Basen, wie z.B. Ethanolamin können verwendet werden.

20 Gegenstand der Erfindung ist ferner die Verwendung der Verbindungen der Formel I als NHE-3-Inhibitoren und/oder ihrer physiologisch unbedenklichen Salze zur Herstellung pharmazeutischer Zubereitungen, insbesondere auf nicht-chemischem Wege. Hierbei können sie zusammen mit mindestens einem festen, flüssigen und/oder halbflüssigen Träger- oder Hilfsstoff und gegebenenfalls in Kombination mit einem oder mereren weiteren Wirkstoffen in eine geeignete Dosierungsform gebracht werden.

25 Gegenstand der Erfindung sind ferner pharmazeutische Zubereitungen, enthaltend mindestens einen NHE-3-Inhibitor der Formel I und/oder eines seiner physiologisch unbedenklichen Salze und Solvate.

30 Diese Zubereitungen können als Arzneimittel in der Human- oder Veterinärmedizin verwendet werden. Als Trägerstoffe kommen organische oder anorganische Substanzen in Frage, die sich für die enterale (z.B. orale),

parenterale oder topische Applikation eignen und mit den neuen Verbindungen nicht reagieren, beispielsweise Wasser, pflanzliche Öle, Benzylalkohole, Alkylenglykole, Polyethylenglykole, Glycerintriacetat, Gelatine, Kohlehydrate wie Lactose oder Stärke, Magnesiumstearat, Talk, Vaseline.

5 Zur oralen Anwendung dienen insbesondere Tabletten, Pillen, Dragees, Kapseln, Pulver, Granulate, Sirupe, Säfte oder Tropfen, zur rektalen Anwendung Suppositorien, zur parenteralen Anwendung Lösungen, vorzugsweise ölige oder wässrige Lösungen, ferner Suspensionen, Emulsionen oder Implantate, für die topische Anwendung Salben, Cremes oder Puder, 10 oder transdermal in Patches.

Die Verbindungen können auch lyophilisiert und die erhaltenen Lyophilisate z.B. zur Herstellung von Injektionspräparaten verwendet werden. Die angegebenen Zubereitungen können sterilisiert sein und/oder Hilfsstoffe wie Gleit-, Konservierungs-, Stabilisierungs- und/oder Netzmittel, Emulgatoren, Salze zur Beeinflussung des osmotischen Druckes, Puffer- 15 substanzen, Farb-, Geschmacks- und /oder ein oder mehrere weitere Wirkstoffe enthalten, z.B. ein oder mehrere Vitamine.

20 Als pharmazeutische Zubereitung für die Verabreichung in Form von Aerosolen oder Sprays sind geeignet z.B. Lösungen, Suspensionen oder Emulsionen des Wirkstoffs der Formel I in einem pharmazeutisch unbedenklichen Lösungsmittel.

25 Die Verbindungen der Formel I und ihre physiologisch unbedenklichen Salze und Solvate können zur Behandlung und/oder Prophylaxe der oben beschriebenen Krankheiten oder Krankheitszuständen verwendet werden.

30 Dabei werden die erfindungsgemäßen Substanzen in der Regel vorzugsweise in Dosierungen zwischen etwa 0,1 und 100 mg, insbesondere zwischen 1 und 10 mg pro Dosierungseinheit verabreicht. Die tägliche Dosierung liegt vorzugsweise zwischen etwa 0,001 und 10 mg/kg Körpergewicht. Die spezielle Dosis für jeden Patienten hängt jedoch von den verschiedenen Faktoren ab, beispielsweise von der Wirksamkeit der eingesetzten speziellen Verbindung, vom Alter, Körpergewicht, allgemeinen Gesundheitszustand, Geschlecht, von der Kost, vom Verabreichungszeit- 35

punkt und -weg, von der Ausscheidungsgeschwindigkeit, Arzneistoffkombination und Schwere der jeweiligen Erkrankung, welcher die Therapie gilt. Die orale Applikation ist bevorzugt.

5 Die Erfindung wird anhand von Beispielen näher erläutert.

Synthese der Wirkstoffe

10 2,2'-Tetramethylendi-1-benzofuran-5-carboxamidin (1) wurde nach O. Dann, H. Char, H. Griesmayer, Liebigs Ann. Chem. 1982, 1836 bis 1869 hergestellt.

15 Analog zu dieser Synthese wurde 2,2'-Hexamethylendi-1-benzofuran-5-carboxamidin (2) hergestellt.

20 2-[2-(6-Amidinoindol-2-yl)ethyl]-1-benzofuran-5-carboxamidin (3) wurde nach der Vorschrift in O. Dann, H. Char, P. Fleischmann, H. Fricke, Liebigs Ann. Chem. 1986, 438 bis 455 hergestellt.

25 trans-1,2-Bis-(5-amidino-2-benzofuranyl)ethylen (4) wurde nach der Vorschrift von O. Dann, G. Volz, E. Demant, W. Pfeifer, G. Bergen, H. Fick, E. Walkenhorst Liebigs Ann. Chem. 1973, 1112 bis 1140 hergestellt.

Für die pharmakologischen Tests wurden jeweils die Dihydrochloride verwendet.

30

Pharmakologische Tests

Im folgenden ist die Methodik dargestellt, die zur Charakterisierung der Verbindungen der Formel I als NHE-3-Inhibitoren verwendet wurde.

35

5 Die Verbindungen der Formel I wurden in bezug auf ihre Selektivität gegenüber den Isoformen NHE-1 bis NHE-3 charakterisiert. Die drei Isoformen wurden in Maus-Fibroblastenzelllinien stabil exprimiert. Die Hemmwirkung der Verbindungen wurde durch Bestimmung der EIPA-empfindlichen $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme in die Zellen nach intrazellulärer Acidose beurteilt.

Material und Methoden

10 LAP1-Zelllinien, die die unterschiedlichen NHE-Isoformen exprimieren

15 Die LAP1-Zelllinien, die die Isoformen NHE-1, -2 und -3 exprimieren (eine Maus-Fibroblastenzelllinie), wurden von Prof. J. Pouysségur (Nice, Frankreich) erhalten. Die Transfektionen wurden nach dem Verfahren von Franchi et al. (1986) durchgeführt. Die Zellen wurden in Dulbeccos modifiziertem Eagle-Medium (DMEM) mit 10% inaktiviertem fötalem Kälberserum (FKS) kultiviert. Zur Selektion der NHE-exprimierenden Zellen wurde das sogenannte "Säureabtötungsverfahren" von Sardet et al. (1989) verwendet. Die Zellen wurden zuerst 30 Minuten in einem NH_4Cl -haltigen bicarbonat- und natriumfreien Puffer inkubiert. Danach wurde das extrazelluläre NH_4Cl durch Waschen mit einem bicarbonat-, NH_4Cl - und natriumfreien Puffer entfernt. Im Anschluß daran wurden die Zellen in einem bicarbonatfreien NaCl -haltigen Puffer inkubiert. Nur diejenigen Zellen, die NHE funktionell exprimieren, konnten in der intrazellulären Ansäuerung, der sie ausgesetzt wurden, überleben.

Charakterisierung von NHE-Hemmstoffen in bezug auf ihre Isoformselektivität

30 Mit den obengenannten Maus-Fibroblastenzelllinien, die die Isoformen NHE-1, NHE-2 und NHE-3 exprimieren, wurden Verbindungen nach der von Counillon et al. (1993) und Scholz et al. (1995) beschriebenen Vorgehensweise auf Selektivität gegenüber den Isoformen geprüft. Die Zellen wurden intrazellulär nach dem NH_4Cl -Prepulse-Verfahren und anschließend durch Inkubation in einem bicarbonatfreien $^{22}\text{Na}^+$ -haltigen Puffer angesäuert. Aufgrund der intrazellulären Ansäuerung wurde NHE aktiviert

und Natrium wurde in die Zellen aufgenommen. Die Auswirkung der Prüfverbindung wurde als Hemmung der EIPA (Ethyl-isopropylamilorid)-empfindlichen $^{22}\text{Na}^+$ -Aufnahme ausgedrückt.

5 Die Zellen, die NHE-1, NHE-2 und NHE-3 exprimierten, wurden in einer Dichte von $5\text{-}7,5 \times 10^4$ Zellen/Näpfchen in Mikrotiterplatten mit 24 Näpfchen ausgesät und 24 bis 48 Stunden bis zur Konfluenz gezüchtet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden 60 Minuten bei 37°C im NH_4Cl -Puffer (50 mM NH_4Cl , 70 mM Cholinchlorid, 15 mM MOPS, pH 7,0) 10 inkubiert. Anschließend wurde der Puffer entfernt und die Zellen wurden rasch zweimal mit dem Cholinchlorid-Waschpuffer (120 mM Cholinchlorid, 15 mM PIPES/Tris, 0,1 mM Ouabain, 1 mM MgCl_2 , 2 mM CaCl_2 , pH 7,4) überschichtet; in diesem Puffer wurden die Zellen 6 Minuten inkubiert. Nach Ablaufen der Inkubationszeit wurde der Inkubationspuffer abgesaugt. 15 Zwecks Entfernung extrazellulärer Radioaktivität wurden die Zellen viermal rasch mit eiskalter phosphatgepufferter Kochsalzlösung (PBS) gewaschen. Danach wurden die Zellen durch Zusatz von 0,3 ml 0,1 N NaOH pro Näpfchen solubilisiert. Die zellfragmenthaltigen Lösungen wurden in Szintillationsröhren überführt. Jedes Näpfchen wurde noch zweimal mit 0,3 ml 20 0,1 N NaOH gewaschen und die Waschlösungen wurden ebenfalls in die entsprechenden Szintillationsröhren gegeben. Die das Zellysat enthaltenden Röhren wurden mit Szintillationscocktail versetzt und die in die Zellen aufgenommene Radioaktivität wurde durch Bestimmung der β -Strahlung bestimmt.

25

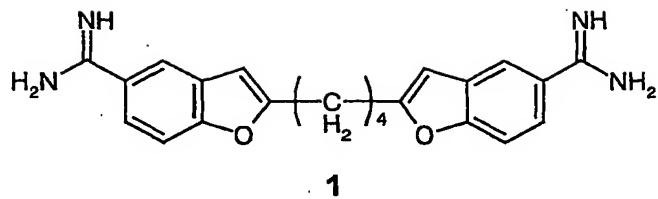
Literatur:

30 Counillon et al. (1993) Mol. Pharmacol. 44: 1041-1045
Franchi et al. (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9388-9392
Morgan und Canessa (1990) J. Membrane Biol. 118, 193-214
Sardet et al. (1989) Cell 56: 271-280
Scholz et al. (1995) Cardiovasc. Res. 29: 260-268.

- 12 -

Testergebnisse

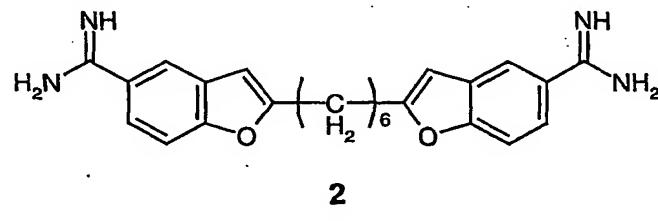
5



10

IC50 (NHE-1) = 2,2 μ MIC50 (NHE-3) = 1,7 μ M

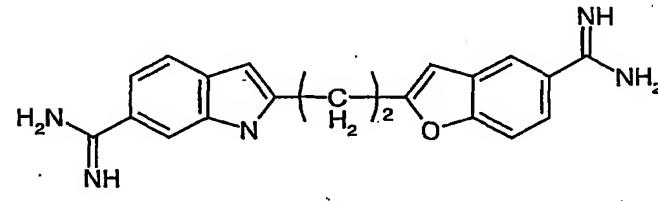
15



20

IC50 (NHE-1) = 2,7 μ MIC50 (NHE-3) = 1,9 μ M

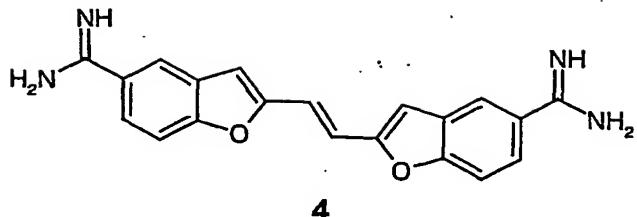
25



30

IC50 (NHE-1) = 4,6 μ MIC50 (NHE-2) = 47,6 μ MIC50 (NHE-3) = 0,98 μ M

35



5

IC₅₀ (NHE-1) = 0,69 μM

IC₅₀ (NHE-3) = 1.5 μ M

10

Beispiel A: Injektionsgläser

15 Eine Lösung von 100 g eines NHE-3-Inhibitors der Formel I und 5 g Dinatriumhydrogenphosphat wird in 3 l zweifach destilliertem Wasser mit 2 n Salzsäure auf pH 6,5 eingestellt, steril filtriert, in Injektionsgläser abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jedes Injektionsglas enthält 5 mg Wirkstoff.

20 Beispiel B: Suppositorien

Man schmilzt ein Gemisch von 20 g eines NHE-3-Inhibitors der Formel I mit 100 g Sojalecithin und 1400 g Kakaobutter, gießt in Formen und lässt erkalten. Jedes Suppositorium enthält 20 mg Wirkstoff.

25

Beispiel C: Lösung

30 Man bereitet eine Lösung aus 1 g eines NHE-3-Inhibitors der Formel I, 9,38 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, 28,48 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ und 0,1 g Benzalkoniumchlorid in 940 ml zweifach destilliertem Wasser. Man stellt auf pH 6,8 ein, füllt auf 1 l auf und sterilisiert durch Bestrahlung. Diese Lösung kann in Form von Augentropfen verwendet werden.

Beispiel D: Salbe

35

- 14 -

Man mischt 500 mg eines NHE-3-Inhibitors der Formel I mit 99,5 g Vaseline unter aseptischen Bedingungen.

Beispiel E: Tabletten

5

Ein Gemisch von 1 kg eines NHE-3-Inhibitors der Formel I, 4 kg Lactose, 1,2 kg Kartoffelstärke, 0,2 kg Talk und 0,1 kg Magnesiumstearat wird in üblicher Weise zu Tabletten verpreßt, derart, daß jede Tablette 10 mg Wirkstoff enthält.

10

Beispiel F: Dragees

15

Analog Beispiel E werden Tabletten gepreßt, die anschließend in üblicher Weise mit einem Überzug aus Saccharose, Kartoffelstärke, Talk, Tragant und Farbstoff überzogen werden.

Beispiel G: Kapseln

20

2 kg eines NHE-3-Inhibitors der Formel I werden in üblicher Weise in Hartgelatinekapseln gefüllt, so daß jede Kapsel 20 mg des Wirkstoffs enthält.

Beispiel H: Ampullen

25

Eine Lösung von 1 kg NHE-3-Inhibitor der Formel I in 60 l zweifach destilliertem Wasser wird steril filtriert, in Ampullen abgefüllt, unter sterilen Bedingungen lyophilisiert und steril verschlossen. Jede Ampulle enthält 10 mg Wirkstoff.

30

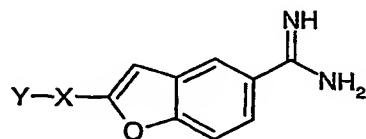
35

- 15 -

Patentansprüche

1. Verbindungen der Formel I

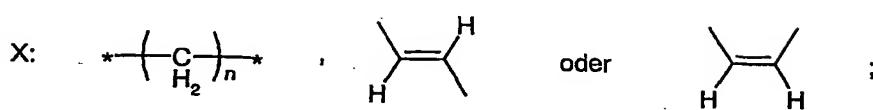
5



10

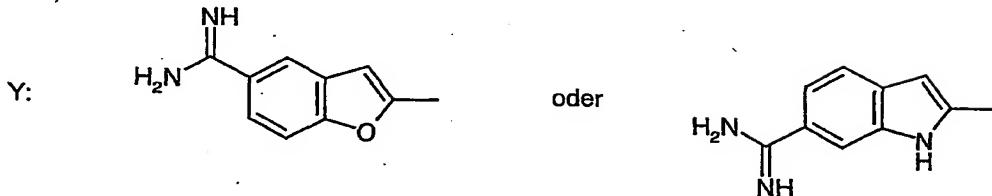
worin bedeuten,

15



n: einen ganzzahligen Wert zwischen 1 und 6;

20



25

sowie deren Salze und Solvate als NHE-3-Inhibitoren.

2. Verbindungen gemäß Anspruch 1:

- a) 2,2'-Tetramethylendi-1-benzofuran-5-carboxamidin (1);
- b) 2,2'-Hexamethylendi-1-benzofuran-5-carboxamidin (2);
- c) 2-[2-(6-Amidinoindol-2-yl)ethyl]-1-benzofuran-5-carboxamidin (3);
- d) trans-1,2-Bis-(5-amidino-2-benzofuranyl)ethylen (4)

sowie deren Salze und Solvate als NHE-3-Inhibitoren.

35

- 16 -

3. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 und ihre physiologisch unbedenklichen Salze und/oder Solvate zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Thrombosen, ischämischen Zuständen des Herzens, des peripheren und zentralen Nervensystems und des Schlaganfalls, ischämischen Zuständen peripherer Organe und Gliedmaßen und zur Behandlung von Schockzuständen.

5

10 4. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 und ihre physiologisch unbedenklichen Salze und/oder Solvate zur Herstellung eines Arzneimittels zum Einsatz bei chirurgischen Operationen und Organtransplantationen und zur Konservierung und Lagerung von Transplantaten für chirurgische Maßnahmen.

15

20 5. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 und ihre physiologisch unbedenklichen Salze und/oder Solvate zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von Krankheiten, bei denen die Zellproliferation eine primäre oder sekundäre Ursache darstellt, zur Behandlung oder Prophylaxe von Störungen des Fettstoffwechsels oder gestörtem Atemantrieb.

25 6. Verwendung von Verbindungen der Formel I nach Anspruch 1 und ihre physiologisch unbedenklichen Salze und/oder Solvate zur Herstellung eines Arzneimittels zur Behandlung von ischämischer Niere, ischämischen Darmerkrankungen oder zur Prophylaxe von akuten oder chronischen Nierenerkrankungen.

30

35 7. Pharmazeutische Zubereitung, gekennzeichnet durch einen Gehalt mindestens eines NHE-3-Inhibitors nach Anspruch 1 und/oder einem seiner physiologisch unbedenklichen Salze und/oder Solvate.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern. Appl. Application No
PCT/EP 01/03474A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C07D405/06 A61K31/34 A61P7/10 C07D307/81

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C07D A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DANN, OTTO ET AL: "Synthesis of antileukemic 2-(2-(indol-2-yl)vinyl)-1-benzofuran and -benzo'b!thiophenes" LIEBIGS ANN. CHEM. (1986), (3), 438-55 , XP001008701 cited in the application formula 1 and 11b page 438	1,2,7
X	GLUTH, WOLFRAM P. ET AL: "Determination of fluorescent diamidines in plasma of experimental animals by high-performance liquid chromatography" J. CHROMATOGR. (1987), 417(2), 331-8 , XP001013486 page 332; figure 1	1,7
	-/-	

 Further documents are listed in the continuation of box C. Patent family members are listed in annex.

*Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the International filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the International filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the International search

3 September 2001

Date of mailing of the International search report

12/09/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Seelmann, I

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intern Application No

PCT/EP 01/03474

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BIELENBERG, G. W. ET AL: "Hypotensive effect of aromatic amidines and imidazolines" ARZNEIM.-FORSCH. (1984), 34(9), 958-67 , 1984, XP000573916 Verbindungen 150/129 und 150/230 page 960	1,2,7
X	DANN O ET AL: "SYNTHESEN BISKATIONISCHER, TRY PANOCIDER 1-BENZOFURAN-VERBINDUNGEN SYNTHESES OF BISCATIONIC, TRY PANOCIDAL 1-BENZOFURAN COMPOUNDS" LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE, VERLAG CHEMIE GMBH. WEINHEIM, DE, no. 10, 1 October 1982 (1982-10-01), pages 1836-1869, XP000644325 ISSN: 0170-2041 cited in the application Verbindungen 19b, 20b, 22f, 22k page 1842	1,2,7
X	DANN O ET AL: "Trypanocide Diamidine mit vier Ringen in einem oder zwei Ringsystemen" JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE, VERLAG CHEMIE GMBH. WEINHEIM, DE, 1973, pages 1112-1140, XP002120347 ISSN: 0075-4617 cited in the application Verbindungen 24d, 25c, 29b page 1118	1,2,7
A	WO 99 33460 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 8 July 1999 (1999-07-08) the whole document	1-7
A	EP 0 825 178 A (HOECHST AG) 25 February 1998 (1998-02-25) cited in the application the whole document	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
 Information on patent family members

Intern. Application No.
PCT/EP 01/03474

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 9933460	A 08-07-1999	AU 1711999	A	19-07-1999
		EP 1041980	A	11-10-2000
		US 6011059	A	04-01-2000
		US 6160134	A	12-12-2000
EP 0825178	A 25-02-1998	DE 19633966	A	26-02-1998
		AT 202338	T	15-07-2001
		AU 713664	B	09-12-1999
		AU 3519297	A	26-02-1998
		BR 9704483	A	29-12-1998
		CA 2213714	A	22-02-1998
		CN 1174833	A, B	04-03-1998
		CZ 9702659	A	18-03-1998
		DE 59703851	D	26-07-2001
		HR 970450	A	31-08-1998
		HU 9701416	A	30-03-1998
		JP 10109970	A	28-04-1998
		NO 973850	A	23-02-1998
		NZ 328639	A	28-01-1999
		PL 321748	A	02-03-1998
		SK 113897	A	04-03-1998
		TR 9700827	A	21-03-1998
		US 6005010	A	21-12-1999

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internales Aktenzeichen

PCT/EP 01/03474

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C07D405/06 A61K31/34 A61P7/10 C07D307/81

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C07D A61K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

CHEM ABS Data, EPO-Internal, WPI Data

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DANN, OTTO ET AL: "Synthesis of antileukemic 2'-2-(indol-2-yl)vinyl!-1-benzofuran and -benzo'b!thiophenes" LIEBIGS ANN. CHEM. (1986), (3), 438-55 , XP001008701 in der Anmeldung erwähnt formula 1 and 11b Seite 438	1,2,7
X	GLUTH, WOLFRAM P. ET AL: "Determination of fluorescent diamidines in plasma of experimental animals by high-performance liquid chromatography" J. CHROMATOGR. (1987), 417(2), 331-8 , XP001013486 Seite 332; Abbildung 1	1,7



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- *A* Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- *E* älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem Internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- *L* Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- *O* Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Aussetzung oder andere Maßnahmen bezieht
- *P* Veröffentlichung, die vor dem Internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist
- *T* Spätere Veröffentlichung, die nach dem Internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- *X* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- *Y* Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erforderlicher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- *&* Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche	Absendedatum des Internationalen Recherchenberichts
3. September 2001	12/09/2001

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl. Fax: (+31-70) 340-3016	Bevollmächtigter Bediensteter Seelmann, I
---	--

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Intern als Aktenzeichen

PCT/EP 01/03474

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	BIELENBERG, G. W. ET AL: "Hypotensive effect of aromatic amidines and imidazolines" ARZNEIM.-FORSCH. (1984), 34(9), 958-67 , 1984, XP000573916 Verbindungen 150/129 und 150/230 Seite 960	1,2,7
X	DANN O ET AL: "SYNTHESEN BISKATIONISCHER, TRY PANOCIDER 1-BENZOFURAN-VERBINDUNGEN SYNTHESES OF BISCATIONIC, TRY PANOCIDAL 1-BENZOFURAN COMPOUNDS" LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE, VERLAG CHEMIE GMBH. WEINHEIM, DE, Nr. 10, 1. Oktober 1982 (1982-10-01), Seiten 1836-1869, XP000644325 ISSN: 0170-2041 in der Anmeldung erwähnt Verbindungen 19b, 20b, 22f, 22k Seite 1842	1,2,7
X	DANN O ET AL: "Trypanocide Diamidine mit vier Ringen in einem oder zwei Ringsystemen" JUSTUS LIEBIGS ANNALEN DER CHEMIE, VERLAG CHEMIE GMBH. WEINHEIM, DE, 1973, Seiten 1112-1140, XP002120347 ISSN: 0075-4617 in der Anmeldung erwähnt Verbindungen 24d, 25c, 29b Seite 1118	1,2,7
A	WO 99 33460 A (SQUIBB BRISTOL MYERS CO) 8. Juli 1999 (1999-07-08) das ganze Dokument	1-7
A	EP 0 825 178 A (HOECHST AG) 25. Februar 1998 (1998-02-25) in der Anmeldung erwähnt das ganze Dokument	1-7

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internes Aktenzeichen

PCT/EP 01/03474

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9933460 A	08-07-1999	AU	1711999 A	19-07-1999
		EP	1041980 A	11-10-2000
		US	6011059 A	04-01-2000
		US	6160134 A	12-12-2000
EP 0825178 A	25-02-1998	DE	19633966 A	26-02-1998
		AT	202338 T	15-07-2001
		AU	713664 B	09-12-1999
		AU	3519297 A	26-02-1998
		BR	9704483 A	29-12-1998
		CA	2213714 A	22-02-1998
		CN	1174833 A, B	04-03-1998
		CZ	9702659 A	18-03-1998
		DE	59703851 D	26-07-2001
		HR	970450 A	31-08-1998
		HU	9701416 A	30-03-1998
		JP	10109970 A	28-04-1998
		NO	973850 A	23-02-1998
		NZ	328639 A	28-01-1999
		PL	321748 A	02-03-1998
		SK	113897 A	04-03-1998
		TR	9700827 A	21-03-1998
		US	6005010 A	21-12-1999

THIS PAGE BLANK (USPTO)

App. No. 10/770,654
Filed: February 3, 2004
Inventor: HEINELT, et al.
Docket No. DEAV2003/0007 US NP
PRIOR ART